

Planes de formación e innovación

MEMORIA DE RESULTADOS

Proyecto de innovación y mejora docente

Título del proyecto

Desarrollo de recursos multimedia de autoaprendizaje relacionados con la identificación y detección molecular de organismos patógenos en el ámbito del Diagnóstico en Fitopatología

Referencia ID2015/0095

Profesor coordinador

M^a Belén Suárez Fernández

Otros participantes

Pilar Sancho García, Ricardo Corral Alonso de Castañeda

Resumen del Proyecto

El objetivo general del proyecto ha consistido en el **desarrollo de un modelo de autoaprendizaje basado en recursos multimedia** que será incorporado el próximo curso a la **asignatura Diagnóstico Molecular en Fitopatología** (impartida en el Máster de Ingeniería Agronómica, dentro del módulo de optatividad del segundo curso), con el fin de que los estudiantes refuercen, consoliden y/o amplíen las competencias adquiridas en las clases prácticas presenciales programadas en la asignatura, aprovechando el potencial del nuevo campus virtual STUDIUM 2 para su implementación. Para la consecución de este objetivo general se han llevado a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. **Se ha generado material multimedia relacionado con la identificación y detección molecular de organismos patógenos de plantas mediante ensayos basados en la técnica de PCR a tiempo real (qPCR).** Se contemplan distintas posibilidades en cuanto al tipo de patógeno (fúngico o nematodos), tipo de muestra (organismo patógeno aislado o muestra vegetal con síntomas de enfermedad), tipo de ensayo (uniplex o multiplex) y tipo de química a utilizar (SYBR Green o sondas Taqman).
2. **Se han elaborado de ejercicios y actividades de entrenamiento para el autoaprendizaje del estudiante en materia de diagnóstico molecular en fitopatología.** Cada ejercicio de entrenamiento plantea al estudiante un supuesto práctico de diagnóstico molecular que debe ser resuelto. Para ello, se suministra al estudiante todos los datos e imágenes necesarios.
3. **Se han incorporado mecanismos interactivos y con *feedback* inmediato en el modelo de autoaprendizaje propuesto,** con el fin de facilitar al propio estudiante la valoración de sus puntos débiles y fuertes en cuanto a la ejecución e interpretación de resultados de las distintas metodologías de diagnóstico planteadas.
4. **Todo el material desarrollado se ha implementado en la nueva plataforma *Stodium* 2,** con el fin de que esté a disposición del estudiante para que pueda visualizarlo y repetir tantas veces como sea necesario los ejercicios de autoaprendizaje.

Introducción

La dificultad técnica que supondría abarcar todas las posibles metodologías y particularidades de los protocolos de diagnóstico en un laboratorio de prácticas, unida a la limitación de tiempo para las clases prácticas y a la necesidad de una utilización eficiente de material y al coste de los reactivos hacen prácticamente inviable implementar una enseñanza práctica en la que los estudiantes lleven a cabo todos los ensayos que serían deseables o que estos ensayos se repitan cuantas veces sean necesarias para la adquisición de todas las habilidades y destrezas implicadas en el diagnóstico molecular. Por todo ello, pensamos que en la asignatura de Diagnóstico Molecular en Fitopatología, impartida en el Máster de Ingeniería Agronómica, dentro del módulo de optatividad del segundo curso (primer semestre), la implementación de herramientas multimedia de aprendizaje autónomo por parte del estudiante ayudará a solventar los problemas de tiempo, coste y complejidad de la disciplina en un laboratorio real.

Resultados

1. Diseño y desarrollo del modelo de autoaprendizaje

1.1. Selección de protocolos de diagnóstico en fitopatología

Se han seleccionado protocolos de diagnóstico avalados por la *European Plant Pathogen Organization* (EPPO), correspondientes a patógenos de cuarentena de interés mundial que causan enfermedades en plantas cuyo diagnóstico se recomienda realizar mediante la técnica de PCR a tiempo real (qPCR). Los criterios de selección de estos protocolos se han basado en la posibilidad que ofrecen de utilizar distintas variantes de la PCR a tiempo real (simple o múltiple), así como distintas químicas (SYBR Green, o sondas Taqman), y por su aplicabilidad en distintos tipos de muestras (patógenos aislados en cultivo puro o muestras vegetales con síntomas de enfermedad), lo cual proporciona un interesante abanico de posibilidades a la hora de plantear supuestos prácticos. En concreto los protocolos seleccionados corresponden a:

1.-Identificación del hongo Fusarium circinatum en cultivo puro mediante PCR a tiempo real

1.1 Utilizando SYBR Green I

1.2. Utilizando sondas Taqman

2.-Detección directa en planta del hongo Fusarium circinatum mediante PCR a tiempo real

2.1 Utilizando SYBR Green I

2.2. Utilizando sondas Taqman

3.- *Identificación múltiple* de los nematodos *Globodera pallida* y *G. rostochiensis* mediante PCR a tiempo real (utilizando SYBR Green I).

4.- *Identificación múltiple* de los nematodos *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* y *G. tabacum* (utilizando sondas Taqman).

1.2 Diseño y elaboración de los ejercicios de autoaprendizaje

Se han desarrollado ejercicios de autoaprendizaje basados en casos prácticos de diagnóstico fitopatológico que permiten al alumno mediante imágenes y esquemas familiarizarse con los protocolos experimentales seleccionados en el apartado anterior, visualizar las técnicas utilizadas en los mismos e interpretar los posibles resultados (ver **Anexo I**). Además, cada ejercicio incluye una serie de supuestos prácticos que dan al alumno la posibilidad de entrenarse en la interpretación de resultados. Cada supuesto práctico contiene a su vez un cuestionario final de respuesta múltiple con información *feedback* que permite la autoevaluación del aprendizaje acerca grado de comprensión del protocolo alcanzado por el alumno y de la adquisición de la competencia para el que se ha diseñado (emisión de un diagnóstico, interpretación de un resultado, etc.) (ver **Anexo II**).

1.3 Programación informática

La programación informática se ha realizado en lenguaje de programación HTML (*HyperText Markup Lenguaje*) utilizando como programa de edición de este lenguaje el Adobe Dreamweaver CS5 (*Adobe Systems Incorporated*). Este lenguaje de programación permite añadir elementos multimedia con texto plano, así como enlazar otros documentos, tanto con el lenguaje de programación HTML como con otros formatos de edición de texto (por ejemplo PDF), y crear enlaces dentro del mismo documento. De esta manera se consigue un enriquecimiento del texto (hipertexto), así como facilidad en su consulta y manejo. Además, en la programación HTML se ha incrustado el *JavaScript*. Éste es otro lenguaje de programación que permite la interactividad necesaria para ofrecer una retroalimentación inmediata en los cuestionarios.

2. Implementación en la plataforma *Studium 2*

Los protocolos y supuestos prácticos de entrenamiento elaborados se han puesto a disposición de los alumnos de la asignatura Diagnóstico Molecular en Fitopatología desde la plataforma *Studium 2*.

La implementación se llevó a cabo, subiendo en bloque los archivos elaborados en HTML a través de los recursos que nos permite la plataforma educativa. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

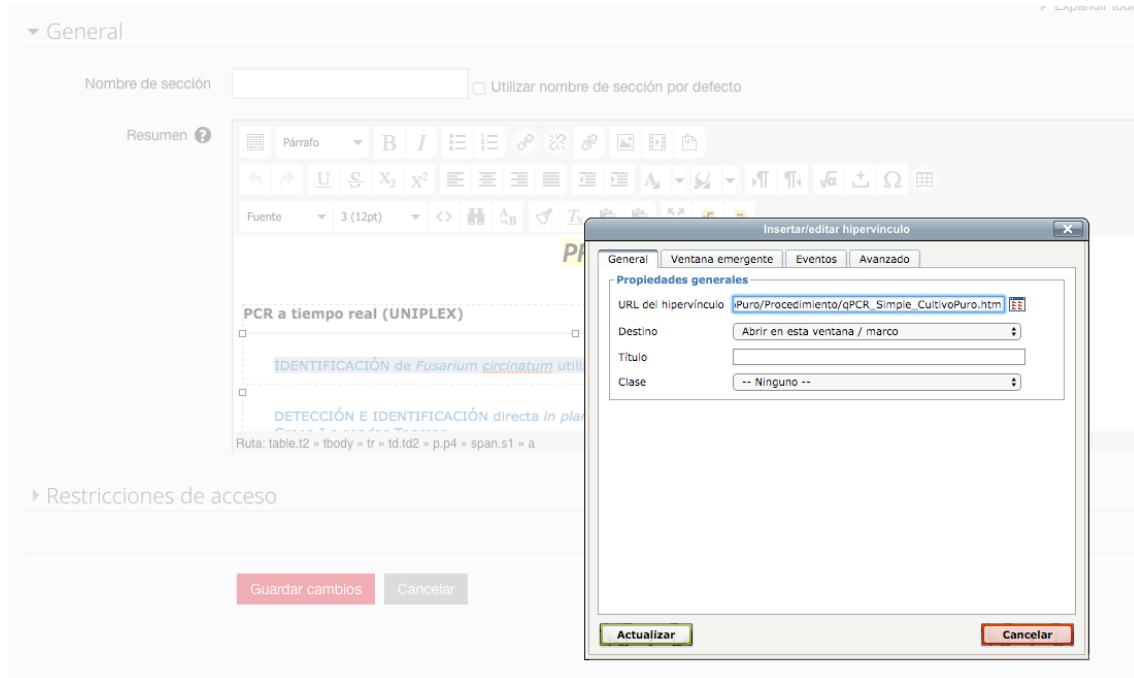
- 1.- Acceder a *Studium* mediante el correo del docente (usuario@usal.es).
- 2.- Agregar actividad o recurso. A través del formulario disponible, cumplimentar el apartado “general” y añadir el conjunto de carpetas comprimidas en formato .ZIP en el apartado “contenido”.

The screenshot shows a web form titled "Agregar un nuevo Archivo a ?" with a help icon. The form is divided into three main sections: "General", "Contenido", and "Apariencia".

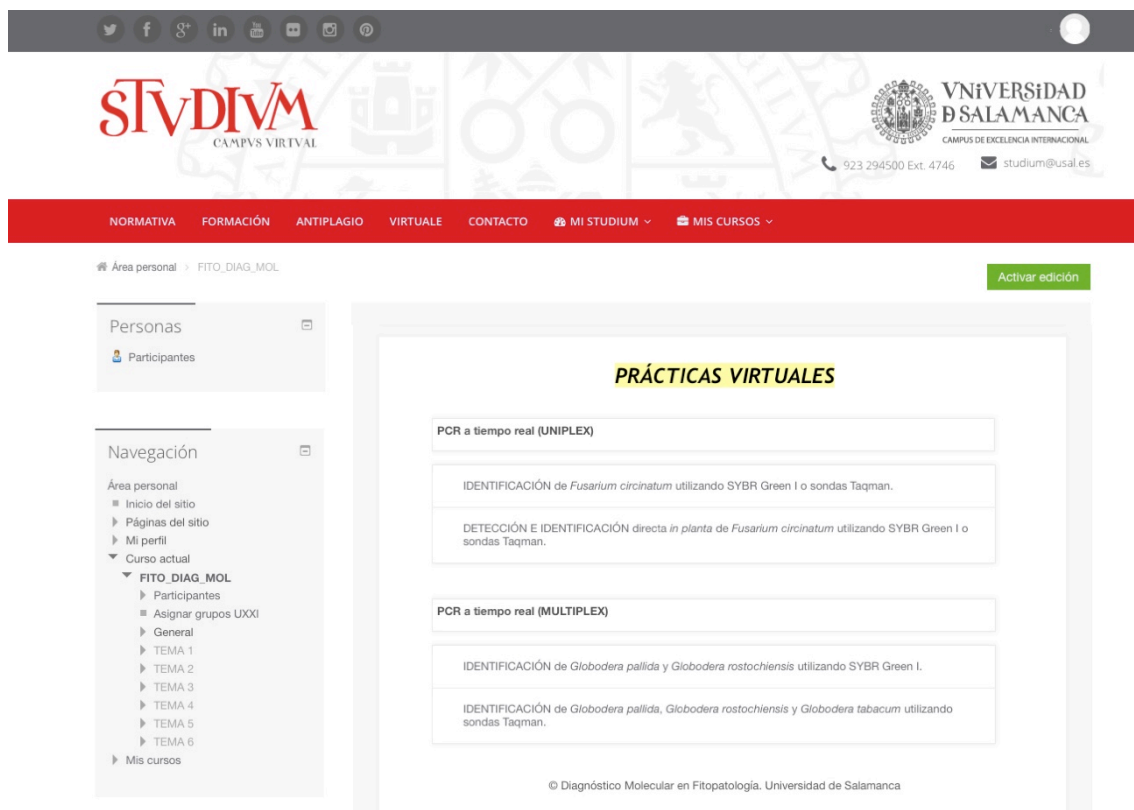
- General section:** Contains a "Nombre*" text input field, a "Descripción*" rich text editor with a toolbar (including bold, italic, list, link, unlink, image, video, and document icons), and a "Muestra la descripción en la página del curso" checkbox with a help icon. The "Ruta:" field is pre-filled with "p".
- Contenido section:** Features a "Seleccionar archivos" label and a "Tamaño máximo para archivos nuevos: 50MB" note. Below is a file manager interface showing a folder named "Archivos" and a large dashed box with a blue arrow pointing down, containing the text "Puede arrastrar y soltar archivos aquí para añadirlos".
- Apariencia section:** Partially visible at the bottom.

3.- Descomprimir y asignar el archivo principal dentro de la plataforma.

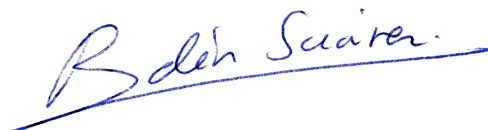
4.- Enlazar en el contenido de la asignatura en el apartado de “Prácticas Virtuales” los distintos protocolos y ejercicios.



5.- Vista final de los ejercicios de autoaprendizaje incorporados a la asignatura Diagnóstico Molecular en Fitopatología en la plataforma *Stodium 2*.



Salamanca, 7 de julio de 2016

A handwritten signature in blue ink, reading "Belén Suárez", with a horizontal line drawn underneath the name.

Fdo.: M^a Belén Suárez Fernández
Profesor Coordinador

ANEXO I. Ejemplo de protocolo experimental multimedia con sus distintos apartados.

Título e introducción del procedimiento de ensayo.


PCR a tiempo real (UNIPLEX)

Procedimiento para la identificación del hongo *Fusarium circinatum* causante del chancro resinoso del pino a partir de un cultivo puro

Según [Protocolo EPPO PM 7/91](#)

A. Introducción

El chancro resinoso del pino es una enfermedad causada por el hongo patógeno de cuarentena *Fusarium circinatum*, anamorfo de *Gibberella circinata*, que afecta a distintas especies de pino (*Pinus sp.*). Esta enfermedad constituye una seria amenaza para los bosques de coníferas debido a la elevada mortalidad de los árboles así como al reducido crecimiento de los mismos y disminución en la calidad de la madera.



Exudados copiosos de resina debajo de los chancros causados por *Gibberella circinata*.

Descripción del procedimiento con sus distintas fases.

B. Detección de *F. circinatum* e identificación mediante PCR a tiempo real (SYBR Green I o Taqman)

Existen distintas posibilidades para llevar a cabo la detección e identificación de *F. circinatum*. A continuación se describen los pasos a seguir para realizar la:

1. **detección del hongo** mediante **aislamiento** del mismo en **cultivo puro** a partir de una muestra de tejido vegetal con síntomas, seguido de un proceso de
2. **identificación morfológica**, **deberá confirmarse** con la aplicación de un ensayo molecular basado en **PCR a tiempo real** (SYBR Green o Taqman).

1. Aislamiento en cultivo puro y observación microscópica del hongo

Según se describe detalladamente en el [protocolo EPPO 7/91](#), la detección de *F. circinatum* se llevará a cabo mediante aislamiento del hongo en cultivo puro a partir de muestras potencialmente infectadas con este hongo, tomando plántulas o bien, en el caso de árboles maduros, astillas de las zonas afectadas, que se colocarán en placas Petri con medio de cultivo semi-selectivo SNA o medio PDA. Previamente, deberá llevarse a cabo un paso de esterilización superficial de las muestras con hipoclorito sódico 1,5% durante 1 min., con el fin de eliminar organismos saprófitos que podrían interferir en el proceso de aislamiento de *F. circinatum*.

A continuación, las placas se incuban durante 10 días a 20 °C para permitir el crecimiento del hongo.

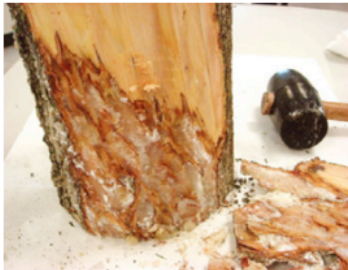


Foto cortesía de E. Landeras. Laboratorio de Sanidad Vegetal de Oviedo.

2. Identificación mediante técnicas moleculares: PCR a tiempo real

2a. Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de un cultivo puro de *F. circinatum* se realiza siguiendo una metodología estándar para la obtención de ADN fúngico según se indica en el protocolo EPPO PM 7/91. Al final del protocolo, la solución de ADN obtenida puede utilizarse directamente para su análisis por PCR, o bien conservarse a -20°C hasta su uso.



2b. Preparación de las reacciones y amplificación

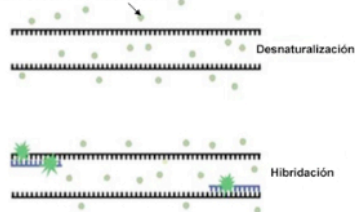
A continuación se describen los dos ensayos de PCR a tiempo real (SYBR Green I o Taqman) recomendados para la identificación molecular de *F. circinatum* a partir de un cultivo puro.

SYBR GREEN I

Uno de los métodos moleculares de identificación de *F. circinatum* a nivel de especie se basa en un ensayo de PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I y los primers específicos CIRC1A (primer directo) y CIRC4A (primer inverso), diseñados por Schweigkofler et al. (2004) a partir de secuencias de la región IGS1 (Inter Genic Spacer) del ADN ribosómico de este hongo.

La composición precisa de la mezcla de reacción, así como las

SYBR Green I no fluorescente



2d. Interpretación de resultados

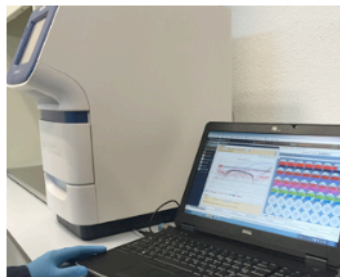
MUESTRA POSITIVA: una muestra es considerada positiva si:

- (i) hay amplificación con los primers específicos de *F. circinatum*; y
- (ii) no la hay en los controles negativos de extracción y PCR (controles externos de contaminación).

NOTA: en el caso de reacciones con SYBR Green I deberá comprobarse la naturaleza del amplicón obtenido en cada muestra por comparación de la temperatura de melting (T_m) con la T_m del control positivo de PCR.

MUESTRA NEGATIVA: una muestra es considerada negativa si:

- (i) no hay amplificación con los primers específicos de *F. circinatum*;
- (ii) hay amplificación con los primers universales de hongos (control interno que confirma que el ADN obtenido de la muestra problema es amplificable); y
- (iii) hay amplificación en el control positivo de PCR (control externo).



| | Muestra POSITIVA | Muestra NEGATIVA |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Muestra fúngica | + | - |
| Control negativo extracción | - | - |
| Control negativo PCR | - | - |
| Control positivo PCR | + | + |
| Control endógeno PCR | + | + |

Enlace de acceso a los distintos supuestos prácticos

C. Supuestos prácticos de entrenamiento en la interpretación de resultados

A continuación se listan distintos supuestos prácticos de identificación de *F. circinatum* a partir de un cultivo puro mediante PCR a tiempo real aplicando los ensayos previamente descritos: SYBR Green y TAQMAN.

Haga clic sobre cada uno de los enlaces para acceder a la interpretación de los distintos supuestos prácticos.

Identificación del hongo *Fusarium circinatum* mediante PCR a tiempo real (SYBR Green 1).

[Supuesto práctico #1](#)

[Supuesto práctico #2](#)

[Supuesto práctico #3](#)

[Supuesto práctico #4](#)

Identificación del hongo *Fusarium circinatum* mediante PCR a tiempo real (sondas Taqman).

[Supuesto práctico #1](#)

[Supuesto práctico #2](#)

[Supuesto práctico #3](#)

ANEXO II. Ejemplo de supuesto práctico de autoaprendizaje.

Título.

Identificación del hongo *Fusarium circinatum* mediante PCR a tiempo real (SYBR Green I).

Supuesto práctico #1

Según **Protocolo EPPO PM 7/91**

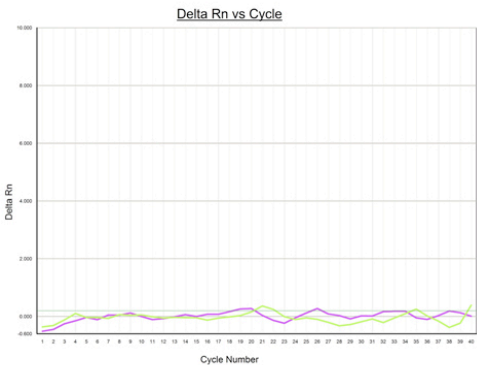
A continuación se representan los resultados obtenidos en la identificación de *F. circinatum* a partir de un cultivo puro mediante PCR a tiempo real aplicando el ensayo previamente descrito basado en SYBR Green I.

Imágenes de resultados.

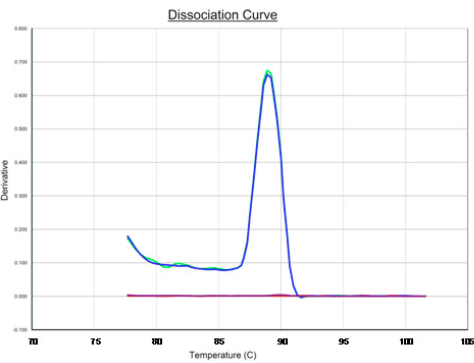
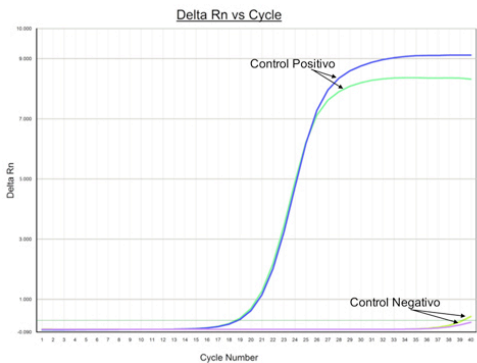
Supuesto práctico #1; Las gráficas con los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Dado que cada muestra, control, etc. se analiza por duplicado, en cada gráfica se observan dos líneas.
(Si desea aumentar el tamaño de la gráfica haga clic sobre la imagen)

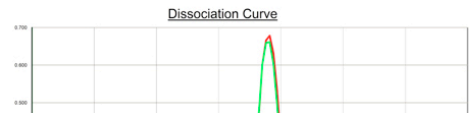
Control negativo extracción



Controles negativo y positivo de PCR



Muestra fúngica problema



Formulario con las preguntas sobre los supuestos prácticos.

| Preguntas |
|---|
| Observe las gráficas de los resultados obtenidos en el laboratorio y conteste a las preguntas haciendo clic sobre el botón de la izquierda |
| 1. Señale la opción INCORRECTA: <input type="radio"/> a) Un control endógeno de PCR nos indica si la muestra problema es amplificable (calidad/cantidad de ADN suficiente) <input type="radio"/> b) Un control positivo de PCR nos indica si la PCR amplifica correctamente <input type="radio"/> c) El control positivo de PCR y el control endógeno son redundantes <input type="radio"/> d) Un control negativo nos indica si hay contaminación cruzada durante el proceso |
| 2.- Considera que los resultados obtenidos en los CONTROLES NEGATIVOS (de extracción y PCR) de este supuesto son: <input type="radio"/> a) Los esperados, por tanto podemos continuar con la interpretación de los resultados <input type="radio"/> b) Indicativos de una posible contaminación cruzada durante el proceso de extracción de ADN <input type="radio"/> c) Indicativos de una posible contaminación cruzada durante la preparación de la PCR <input type="radio"/> d) Indicativos de que la PCR no amplifica correctamente |
| 3. En conjunto, los resultados obtenidos en el CONTROL POSITIVO de PCR y el CONTROL ENDOGENO de este supuesto indican que: <input type="radio"/> a) La PCR amplifica correctamente y la muestra problema es amplificable (calidad/cantidad de ADN suficiente) <input type="radio"/> b) La PCR amplifica correctamente pero la muestra problema no es amplificable (calidad/cantidad de ADN insuficiente) <input type="radio"/> c) La PCR no amplifica correctamente, por tanto, no podemos saber si la muestra problema es amplificable (calidad/cantidad de ADN suficiente) |
| 4. A la vista de los resultados obtenidos en los controles, señale la opción CORRECTA en relación al resultado obtenido en la muestra problema: <input type="radio"/> a) Hay amplificación y la Tm es la esperada <input type="radio"/> b) Hay amplificación pero la Tm es mayor de lo esperado <input type="radio"/> c) Hay amplificación pero la Tm es menor de lo esperado <input type="radio"/> d) Resultado no válido, requiere confirmación |
| 5. Según los resultados obtenidos en este supuesto práctico, considera que la muestra problema es: <input type="radio"/> a) Positiva, el hongo aislado es <i>Fusarium circinatum</i> <input type="radio"/> b) Negativa, el hongo aislado no es <i>Fusarium circinatum</i> <input type="radio"/> c) Un posible falso positivo, debemos repetir el análisis <input type="radio"/> d) Un posible falso negativo, debemos repetir el análisis <input type="radio"/> e) Dudosa, requiere confirmación |

OBTENER RESULTADOS

Página de respuesta con la corrección del supuesto práctico y la calificación obtenida.

Resultados Ejercicio

1. Señale la opción INCORRECTA:

- a) Un control endógeno de PCR nos indica si la muestra problema es amplificable (calidad/cantidad de ADN suficiente) **Fallada**
- b) Un control positivo de PCR nos indica si la PCR amplifica correctamente
- c) El control positivo de PCR y el control endógeno son redundantes **La correcta**
- d) Un control negativo nos indica si hay contaminación cruzada durante el proceso;

2.- Considera que los resultados obtenidos en los CONTROLES NEGATIVOS (de extracción y PCR) de este supuesto son:

- a) Los esperados, por tanto podemos continuar con la interpretación de los resultados **La correcta**
- b) Indicativos de una posible contaminación cruzada durante el proceso de extracción de ADN
- c) Indicativos de una posible contaminación cruzada durante la preparación de la PCR **Fallada**
- d) Indicativos de que la PCR no amplifica correctamente;

3. En conjunto, los resultados obtenidos en el CONTROL POSITIVO de PCR y el CONTROL ENDOGENO de este supuesto indican que:

- a) La PCR amplifica correctamente y la muestra problema es amplificable (calidad/cantidad de ADN suficiente) **La correcta**
- b) La PCR amplifica correctamente pero la muestra problema no es amplificable (calidad/cantidad de ADN insuficiente)
- c) La PCR no amplifica correctamente, por tanto, no podemos saber si la muestra problema es amplificable (calidad/cantidad de ADN suficiente) **Fallada**

4. A la vista de los resultados obtenidos en los controles, señale la opción CORRECTA en relación al resultado obtenido en la muestra problema:

- a) Hay amplificación y la Tm es la esperada **Acertada**
- b) Hay amplificación pero la Tm es mayor de lo esperado
- c) Hay amplificación pero la Tm es menor de lo esperado
- d) Resultado no válido, requiere confirmación

5. Según los resultados obtenidos en este supuesto práctico, considera que la muestra problema es:

- a) Positiva, el hongo aislado es *Fusarium circinatum* **Acertada**
- b) Negativa, el hongo aislado no es *Fusarium circinatum*
- c) Un posible falso positivo, debemos repetir el análisis
- d) Un posible falso negativo, debemos repetir el análisis
- e) Dudosa, requiere confirmación

| |
|--|
| Resultados: Acertadas: 2 Falladas: 3 No contestadas: 0 |
| Nota: 4.0/10 |